

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平8-92114

(43)公開日 平成8年(1996)4月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	ADD M	8217-4C		
A 0 1 H 4/00				
C 0 7 H 15/256				
C 0 7 J 9/00		7433-4C		
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	F
			審査請求 未請求 請求項の数 9 FD (全 14 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-251509

(71)出願人 000135265

株式会社ネオス

兵庫県神戸市中央区磯辺通3丁目1番2号

(22)出願日 平成6年(1994)9月19日

(72)発明者 大川 直士

滋賀県甲賀郡甲西町大池町1の1 株式会
社ネオス中央研究所内

(72)発明者 後藤 智啓

滋賀県甲賀郡甲西町大池町1の1 株式会
社ネオス中央研究所内

(72)発明者 館場 啓三

滋賀県甲賀郡甲西町大池町1の1 株式会
社ネオス中央研究所内

(74)代理人 弁理士 三枝 英二 (外4名)

(54)【発明の名称】 薬用人参未分化培養細胞から得られるサポニン類の製造方法

(57)【要約】

【構成】 薬用人参植物体より分裂組織を摘出し、植物ホルモンを含むカルス誘導用培地で該分裂組織のカルスを誘導し、該カルス誘導用培地で継代培養後、該カルス誘導用培地のホルモン組成を変更した再分化誘導用培地で継代培養を行い、該継代培養時に再分化してくる細胞塊を分別除去することによって得られる未分化細胞塊を、培養して成分抽出を行うことを特徴とするサポニン類の製造方法。

【効果】 本発明のサポニンの製造方法により、年間を通じてサポニンを安定供給でき、食品、生薬、あるいは医薬分野の製薬原料として利用することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬用人参植物体の組織を、カルス誘導用培地で継代培養後、得られたカルスを再分化誘導用培地で継代培養をし、該継代培養時に再分化してくる細胞塊を除去することによって得られる未分化細胞塊を、培養して成分抽出を行うことを特徴とするサボニン類の製造方法。

【請求項2】 薬用人参植物体から誘導されるカルスを、カルス誘導用培地で継代培養し、軟質化したカルスを再分化誘導用培地で培養し、再分化した細胞塊を除去することを特徴とする未分化細胞塊の製造方法。

【請求項3】 再分化誘導用培地で器官を形成しない、薬用人参植物体から誘導される未分化細胞塊。

【請求項4】 カルス誘導用培地のオーキシン及びサイトカイニン類の濃度が、それぞれ $10^{-7} \sim 10^{-6}$ Mであり、且つ、オーキシン濃度が、サイトカイニン類の濃度以上であることを特徴とする、請求項1に記載のサボニン類の製造方法。

【請求項5】 カルス誘導用培地での誘導カルスの継代培養期間が、継代周期4~6週間毎で、3~10世代であることを特徴とする、請求項1又は4に記載のサボニン類の製造方法。

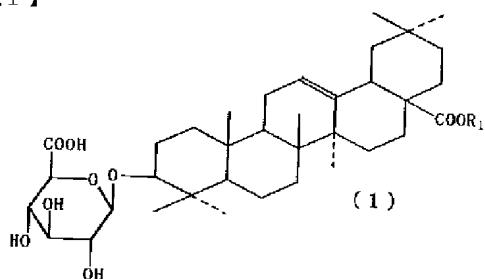
【請求項6】 再分化誘導用培地のオーキシンの濃度が、 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ Mであり、サイトカイニン類の濃度が、オーキシンの濃度の $1/10 \sim 1/100$ であることを特徴とする、請求項1に記載のサボニン類の製造方法。

【請求項7】 再分化誘導用培地に、炭素源、酢酸メバロン酸経路上の各物質、植物ステロール生合成阻害剤、サボニン生産向上させる細菌等の微生物、又はその抽出成分を単独又は組み合わせて添加することを特徴とする請求項1に記載のサボニン類の製造方法。

【請求項8】 薬用人参植物体がトチバニンジンである請求項1に記載のサボニン類の製造方法。

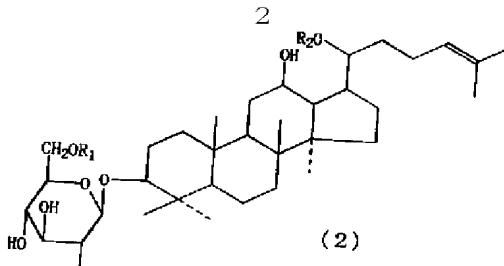
【請求項9】 請求項8の製造方法により得られる下記一般式(1)、(2)及び(3)のサボニン類。

【化1】



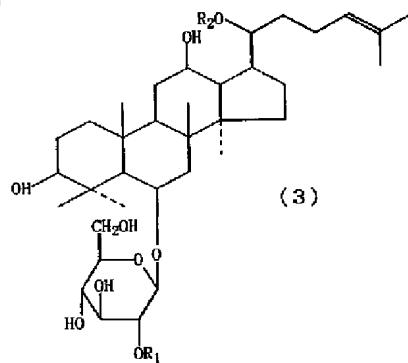
〔式中、R₁ は、H又は1-ヘキソースである。〕

【化2】



〔式中、R₁、R₂ は、H又は1-ヘキソースであるが、ともに1-ヘキソースではない。〕

【化3】



〔式中、R₁、R₂ は、前記に同じ。〕

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、サボニンの製造方法、サボニンを生産する未分化細胞塊及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】サボニンなど植物界に広く分布する配糖体は、植物に含まれる成分としては、微量であり、それらを大量に必要とする場合は、大量の植物を必要とした。そのため、近年では、植物細胞の大量培養により抽出されている。

【0003】例えば、薬用人参培養細胞でのサボニン合成法では、成分抽出原料となる培養細胞は、一部、あるいは全体が形態的に分化した培養細胞を利用している(Furuya, T., et al., Planta medica, 48, 83(1983))が、これらの培養細胞から得られるサボニンは植物体含有のサボニンと同一の配糖数の多いサボニンが多く、しかもこれらの培養細胞の増殖活性は低かった。配糖数の少ないサボニンは、従来のサボニンにはない薬理効果が期待されるが、その合成は、通常の配糖数の多いサボニンの糖鎖を化学的又は酵素的に加水分解し、得られるアグリコンの再配糖化を行う必要があり、容易には得られなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、薬用人参植物体から、従来のサボニンにはない薬理効果が期待される短糖鎖サボニンを得るためのサボニン類の製造方法及

3

び該サポニン類を生産する細胞を提供するものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記技術に鑑み、研究を重ねた結果、薬用人参植物体から誘導されたカルスを、一定期間以上の脱分化状態を経させ、次いで、再分化条件にて培養を行い、再分化する細胞塊を除去することにより、高増殖性を示し、かつ均一な未分化細胞塊の培養細胞系統を確立し、この未分化培養細胞が生産するサポニンを得ることができた。

【0006】即ち、本発明は、薬用人参植物体の組織を、カルス誘導用培地で継代培養後、得られたカルスを再分化誘導用培地で継代培養をし、該継代培養時に再分化してくる細胞塊を除去することによって得られる未分化細胞塊を、培養して成分抽出を行うことを特徴とするサポニン類の製造方法である。

【0007】また、本発明は、薬用人参植物体から誘導されるカルスを、カルス誘導用培地で継代培養し、軟質化したカルスを再分化誘導用培地で培養し、再分化した細胞塊を除去することを特徴とする未分化細胞塊の製造方法である。

【0008】さらに、本発明は、再分化誘導用培地で再分化しない、薬用人参植物体から誘導される未分化細胞塊でもある。

【0009】本発明において、薬用人参植物体とは、ウコギ科 (Araliaceae) のPanax 属の植物で、例えば、オタネニンジン (Panax ginseng C.A.Meyer)、トチバニンジン (Panax japonicus C.A.Meyer) 等が挙げられ、特にトチバニンジンが好ましい。

【0010】本発明に用いられるカルス誘導用培地は、植物ホルモンを含んだ、一般的に植物細胞の培養に用いられる培地が使用でき、例えば、MS 基本培地やB5 基本培地に植物ホルモンを添加したものが使用できる。

【0011】上記培地は、通常、硝酸塩、アンモニウム塩、磷酸塩、硫酸塩、K、Fe、Mg 塩等の無機栄養塩類、ビタミン類 (ニコチン酸等)、アミノ酸 (グリシン等)、ミオイノシトール等の有機物質、及び1~5%の炭素源 (ショ糖、グルコース、フルクトース、マルトース等) を含み、その他に0.5~1%の寒天を添加し、固体培地としてもよい。

【0012】上記培地に添加する植物ホルモンとしては、オーキシンとサイトカイニン類が挙げられ、オーキシン及びサイトカイニンを併用するのが好ましい。

【0013】上記オーキシンとしては、天然オーキシン (Indole-3-acetic acid, Indole-3-acetonitrile 等) と、合成オーキシン (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, Indole-3-butryic acid 等) が挙げられ、ジベレリンは除く。同濃度であれば、2,4-Dichlorophenoxyacetic acidを用いるのがよく、カルスを効率よく誘導できる。

【0014】上記サイトカイニン類としては、天然サイ

4

トカイニン (Zeatin等) と合成サイトカイニン (Kinetin, 6-Benzylamino purine等) が挙げられ、6-Benzylamin o purineを用いるのが好ましい。

【0015】上記植物ホルモンは、オーキシンを必須とし、少なくとも一種以上含んでいればよい。

【0016】上記植物ホルモンの添加濃度は、 10^{-7} ~ 10^{-5} M、好ましくは、 10^{-6} ~ 10^{-5} Mである。

【0017】また、オーキシンとサイトカイニン類を併用する場合は、サイトカイニン類の濃度は、 10^{-7} ~ 10^{-5} Mであり、オーキシン濃度がサイトカイニン類の濃度以上であることが好ましい。

【0018】本発明の再分化誘導用培地は、上記カルス誘導用培地のオーキシンを、ジベレリンを除く天然オーキシン又はその誘導体に替えたものであり、その濃度は、 10^{-7} ~ 10^{-5} M、好ましくは、 10^{-7} ~ 10^{-6} Mである。また、サイトカイニン類の添加濃度は、添加オーキシンの $1/10$ ~ $1/100$ とするのが好ましい。

【0019】上記ジベレリンを除く天然オーキシン又はその誘導体は、具体的には、Indole-3-acetic acid、Indole-3-butyric acid、Indole-3-acetonitrile、Indole-3-propionic acid、4-Chloroindole-3-acetic acid、Indole-1-acetic acid、2-Methyl-indole-3-acetic acid、 α -Naphthaleneacetic acid が挙げられ、好ましくは、Indole-3-butyric acid である。

【0020】また、サイトカイニン類は、カルス誘導用培地と同じものを使用できるが、Kinetin が好ましい。

【0021】本発明では、先ず、薬用人参植物体の組織を、カルス誘導用培地で継代培養を行うが、該継代培養は、通常、継代周期が、4~6週間毎で3~10世代、好ましくは、4~5週間毎で、3~7世代である。

【0022】尚、3世代以上経過したカルスは、誘導初期のカルスと比較して軟質となる。

【0023】この軟質のカルスを、カルス誘導用の培地から、寒天を除いた液体培地に継代し、18~27°C、好ましくは、20~25°Cでの暗所、100~120 rpmの旋回振盪培養を行う。

【0024】この液体振盪培養でカルスは、直径0.3~2 cmの球状細胞塊の形態で盛んに増殖する。

【0025】次に、得られた球状細胞塊を再分化誘導用培地で継代培養を行うが、該継代培養期間は、2~5週間毎で1世代以上、好ましくは、2~3週間毎で、2世代以上である。

【0026】上記再分化誘導用培地での培養では、培養時に再分化する細胞塊があるが、このような細胞塊は取り除き、再分化しない未分化細胞塊のみを培養する。

【0027】再分化する細胞塊を取り除く方法としては、ピンセットや金属針などでつまみ上げたり、0.5~2 cmの穴を有するメッシュを使用してもよい。

【0028】数回の分別除去で得られた未分化細胞塊は、再分化することなく、均一な培養細胞系統として継

代維持されている。

【0029】さらに、上記未分化細胞塊を、18~27°C、好ましくは、20~25°Cで、100~120 rpmの旋回振盪培養を行う。

【0030】上記未分化細胞塊又はその培養液からサボニンを抽出する方法としては、カラムやHPLCなどの公知の方法に従う。

【0031】尚、本発明の製造方法を、トチバニンジンで行った場合は、サボニンは、2種類得られ、一つは構造既知の化合物であるが、もう一つは、トチバニンジンからは得られない化合物である。

【0032】本発明の製造方法により得られる一般式(1)、(2)及び(3)で表わされる化合物において、1-ヘキソースとしては、グルコース、ガラクトース、マンノースが例示される。

【0033】また、一般式(2)及び(3)で表わされる化合物において、R₁、R₂の組み合わせとしては、R₁及びR₂が水素、R₁がヘキソースでR₂が水素、R₁が水素でR₂がヘキソース、の三種類が挙げられ、好ましくはR₁及びR₂が水素である。

【0034】本発明では、未分化細胞塊の大量培養は、再分化誘導用培地で行うが、再分化誘導用培地に、炭素源、酢酸メバロン酸経路上の各物質、植物ステロール生合成阻害剤、サボニン生産を向上させる細菌等の微生物又はその抽出成分を、単独又は組み合わせて添加して大量培養することもできる。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、上記組織培養方法により薬用人参植物体から高増殖活性を持ち、且つサボニンを生産する培養細胞系統が得られることにより、年間を通じてサボニンを安定供給でき、食品、生薬、あるいは医薬分野の製薬原料として利用することができる。

【0036】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0037】実施例1

京都府内山林に自生のトチバニンジン(*Panax japonicus* C.A.Meyer)植物体を採取した。植物体の根茎を、70% MeOH、1%次亜塩素酸、3%過酸化水素水の順で表面殺

菌し、根茎の分裂組織部分を、1962年のMurashige and Skoog (MS)の栄養塩(表1)、2%Sucrose、10⁻⁶M 2, 4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)、10⁻⁶M BAP(6-Benzyl-amino purine)、0.7%寒天の組成のファルコンシャーレのカルス誘導用培地に植えた。25°Cの暗所で培養を行ったところ、約2週間後に組織片から不定形の細胞塊(カルス)が生じた。

【0038】約1ヶ月後、生じたカルスのみを同一の新鮮培地に移植し、以後、4週間毎に継代培養を行った。

10 カルス誘導から3~4代目にカルスが白色軟質となり、さかんに増殖するようになった。

【0039】誘導より6代目に、カルス誘導用培地から寒天を除いた組成の100mlフラスコ(培地量:40ml)の液体培地にカルスを移植し、23°C、暗所、120rpmの液体旋回振盪培養を開始した。20日後、培養器を500mlフラスコ(培地量:120ml)にスケールアップし、以後、20日毎に継代培養した。この液体振盪培養細胞は、直径3~20mmの球状細胞塊の形態で増殖した。

20 【0040】液体振盪培養を開始して3代目の球状細胞塊を、NH₄態窒素(NH₄NO₃)を除いたMS栄養塩(NH₄freeMS)、2%Sucrose、10⁻⁶M IBA(3-Indole butyric acid)、10⁻⁷M Kinetinの液体培地(再分化誘導用培地)に植えかえたところ、継代2~3代目で球状細胞塊の中には不定根が生じた細胞塊が確認された。球状細胞塊と不定根の発生が見られる細胞塊との分離を継代培養毎に繰り返した結果、球状細胞塊系統と不定根系統の2種類の培養細胞系統が得られた。

【0041】不定根系統は、再分化誘導用培地の栄養塩を1975年のB5培地の栄養塩(表1)に変更した液体培地(液体振盪継代用培地)で、良好に根を伸長し、根の分枝も観察された。

【0042】同様に、球状細胞塊も液体振盪継代用培地でよく成長し、20日間の培養で、継代時の植え込み量2.5gに対して、約40gの新鮮重量増加(約16倍)を示した。

【0043】

【表1】

7
MS培地とB5培地の栄養塩の成分表

成分	MS栄養塩 (mg/l)	B5栄養塩 (mg/l)
KNO ₃	1900	2500
NH ₄ NO ₃	1650	
(NH ₄) ₂ SO ₄		134
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	
KH ₂ PO ₄	170	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		150
MnSO ₄ ·H ₂ O		10
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	
KI	0.83	0.75
H ₃ BO ₃	6.2	3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2
CuSO ₄		0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	
Na ₂ -EDTA	37.3	
NaFe-EDTA-3H ₂ O		40
ミオ-イグトール	100	100
アシン-HCl	0.1	10
ニチソウ糖	0.5	1
ビリドキシル-HCl	0.5	1
グリシン	2	

8

【0044】液体振盪継代用培地で、20日間培養を行った球状細胞塊を乾燥させ、MeOHでソックスレー抽出を行った(2. 5~3時間)。抽出液を乾固し、日本ミリポア社製Sep-Pak C18 カートリッジに保持させて水洗浄を行った。その後のMeOH溶出の分画をHPLCのSampleとした。

【0045】HPLC分析は、ネオス社製Fluofix カラム(4mm径×150mm)、カラム温度：40°C、移動相：20%から80%のCH₃CNのグラジェント(20mMリン酸緩衝液を含む。)、流速：1ml/min、検出：UV(203nm)の条件で行った。

【0046】TLC分析は、Merck 社製Kieselgel 60 F₂₅₄ を用い、Sampleをスポットした後、CHC₁₃ : CH₃OH : H₂O = 65 : 35 : 10(下層)で展開し、濃硫酸噴霧後、120°Cで加熱して発色させた。植物体根茎から抽出したチクセツサボニン群は、赤~青紫の発色を示し、UV下で蛍光を発した。

【0047】HPLC分析では、20以上のピークが検出された。個々のピークをHPLCで分取し、TLC分析を行ったところ、赤紫の発色とUV下での蛍光を示すのは、2ピークだけだった。以下、この2ピークの物質(高極性の方をTSB1、低極性の方をTSB2とした。)について、更に分取を重ね、2物質をそれぞれ単離精製した(図

* 1)。

【0048】TSB2の¹H-NMRを測定したところ、oleanoric acidの基本骨格の1,2、18位Hの特徴的ピークと、糖の5つのピークが見られ、積分値からoleanoric acidの一配糖体であることが解った。更に、oleanoric acidから合成されたoleanoric acid 3-O-glucosideの¹H-NMRスペクトルと非常に類似しており、3位Hのピークが一致していること、glucosideの6'位Hの特徴的ピークが見られないことなどから、3位のOH基にglucronic acidが配糖していることが解った。このoleanoric acid 3-O-glucronideは砂糖大根(Sugar beet)にその存在が知られているが、チクセツニンジンからは、このようなサボニンは報告されていない。

【0049】TSB1は、植物体に微量検出されるチクセツサボニンIVaのHPLCの溶出時間とTLCの移動度が一致し、同一物質であることが示唆された。更に、TSB1の二次元¹H-NMR分析(2D-¹H-COSY and NOESY)により、チクセツサボニンIVaとの構造の一致が確認された。

【0050】
【化4】

10

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、球状細胞塊の含有成分のHPLC分析チャートを示す。

【図2】図2は、oleanoric acidの¹H-NMRスペクトル(重ビリジン)を示す。

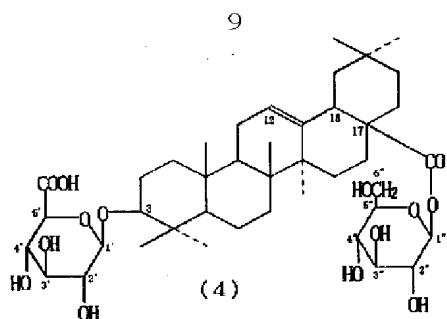
【図3】図3は、oleanoric acid 3-O-glucosideの¹H-NMRスペクトル(重ビリジン)を示す。

【図4】図4は、TSB1の¹H-NMRスペクトル(重ビリジン)を示す。

10 【図5】図5は、TSB2の¹H-NMRスペクトル(重ビリジン)を示す。

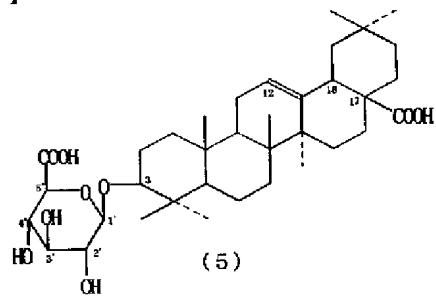
【図6】図6は、TSB1の二次元¹H-NMRスペクトル(COSY)を示す。

【図7】図7は、TSB1の二次元¹H-NMRスペクトル(NOESY)を示す。



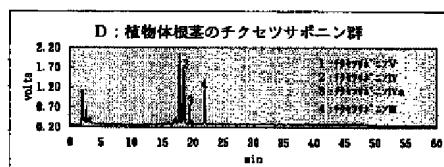
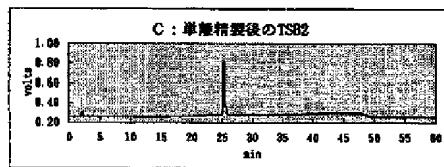
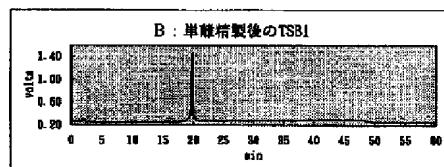
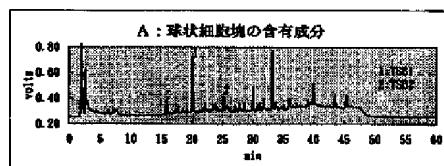
【0051】

【化5】

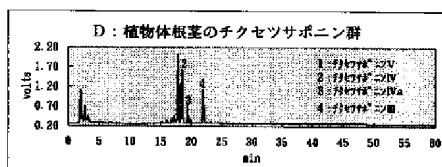
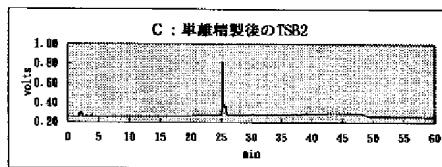
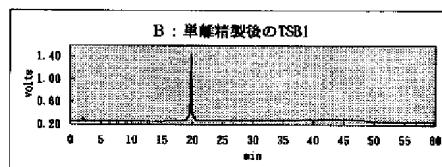
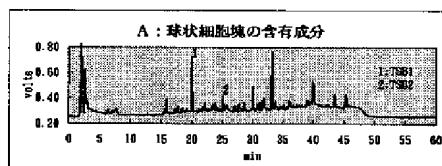


【図1】

球状細胞塊含有成分のHPLCチャート

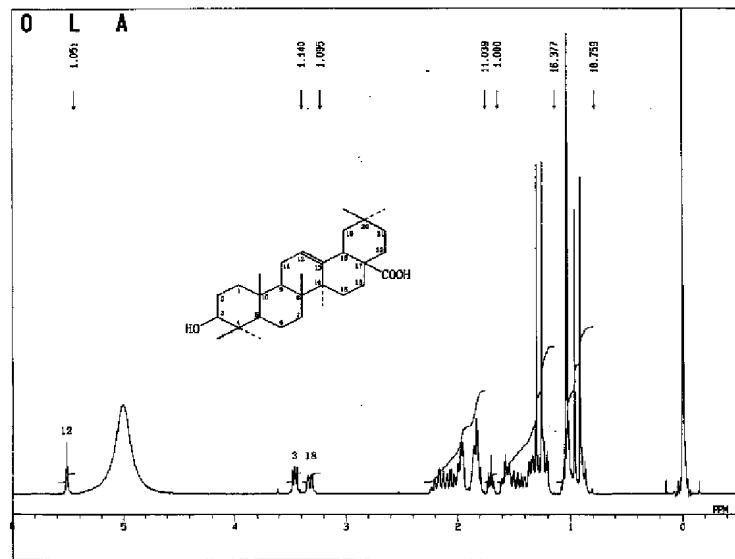
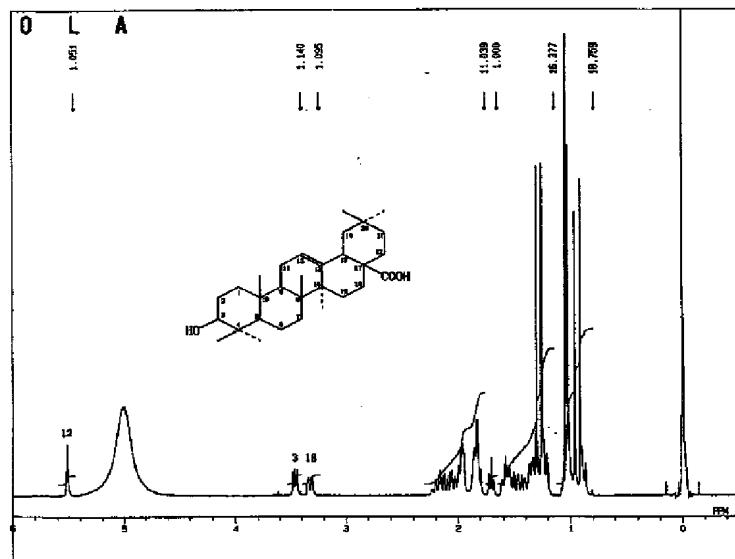


球状細胞塊含有成分のHPLCチャート

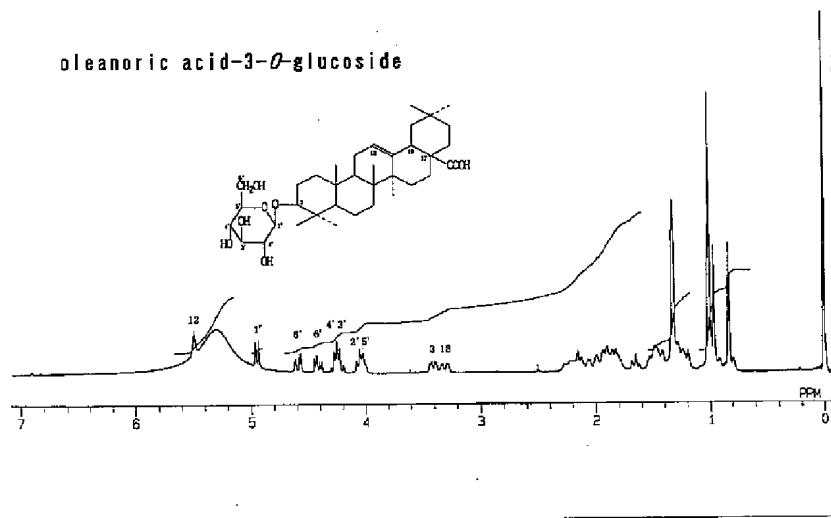
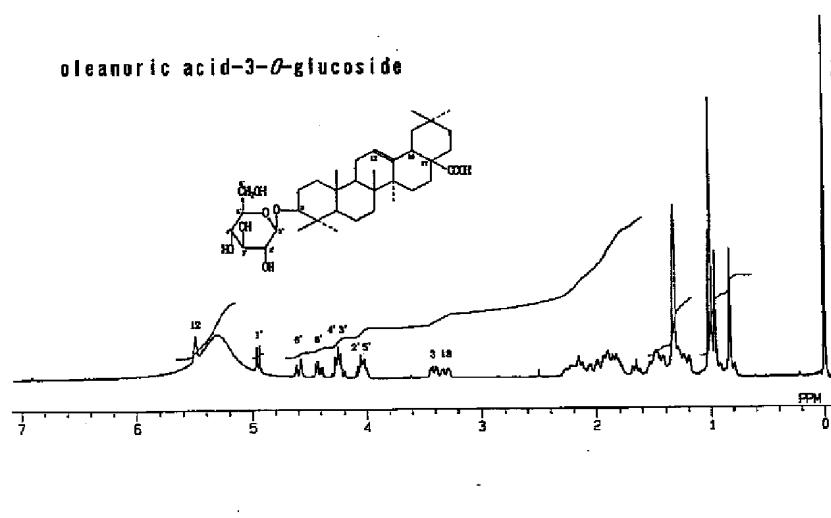


20

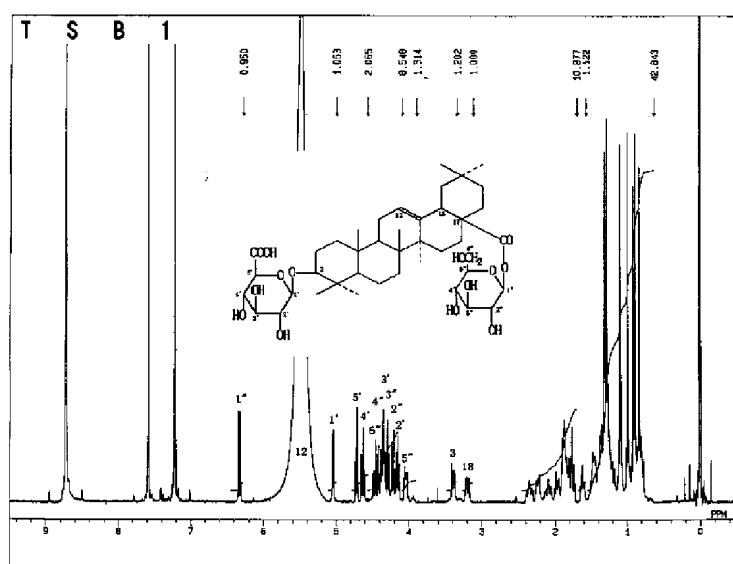
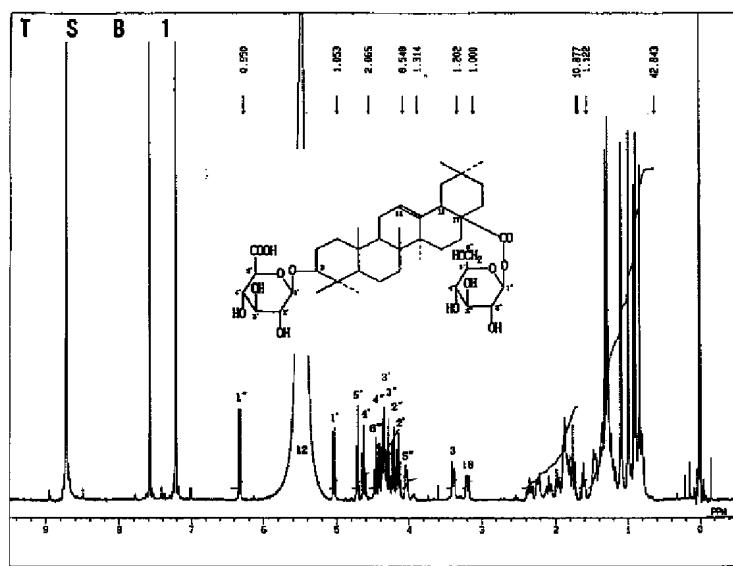
【図2】



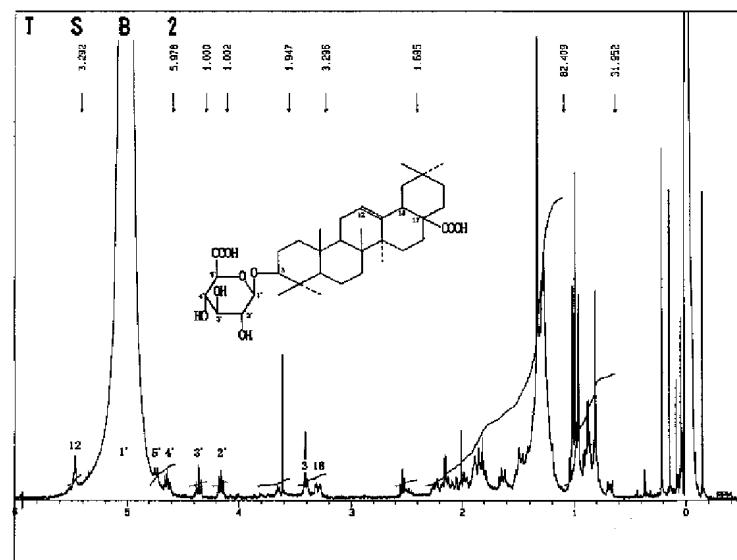
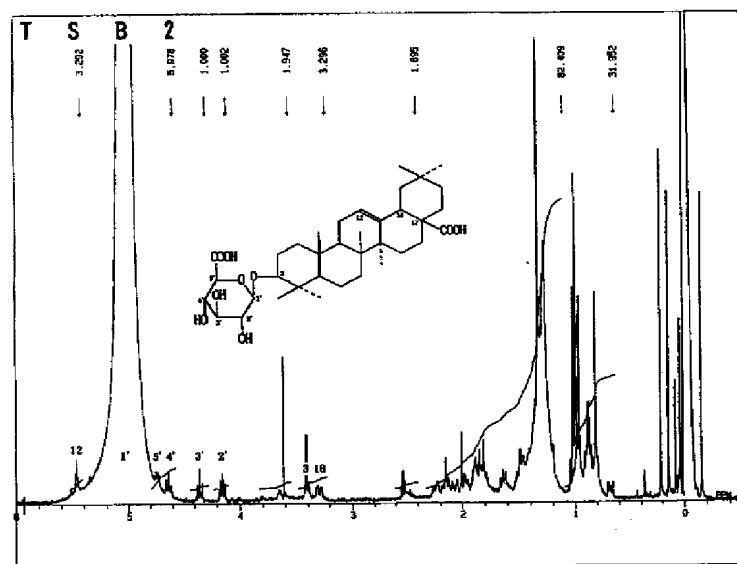
【図3】



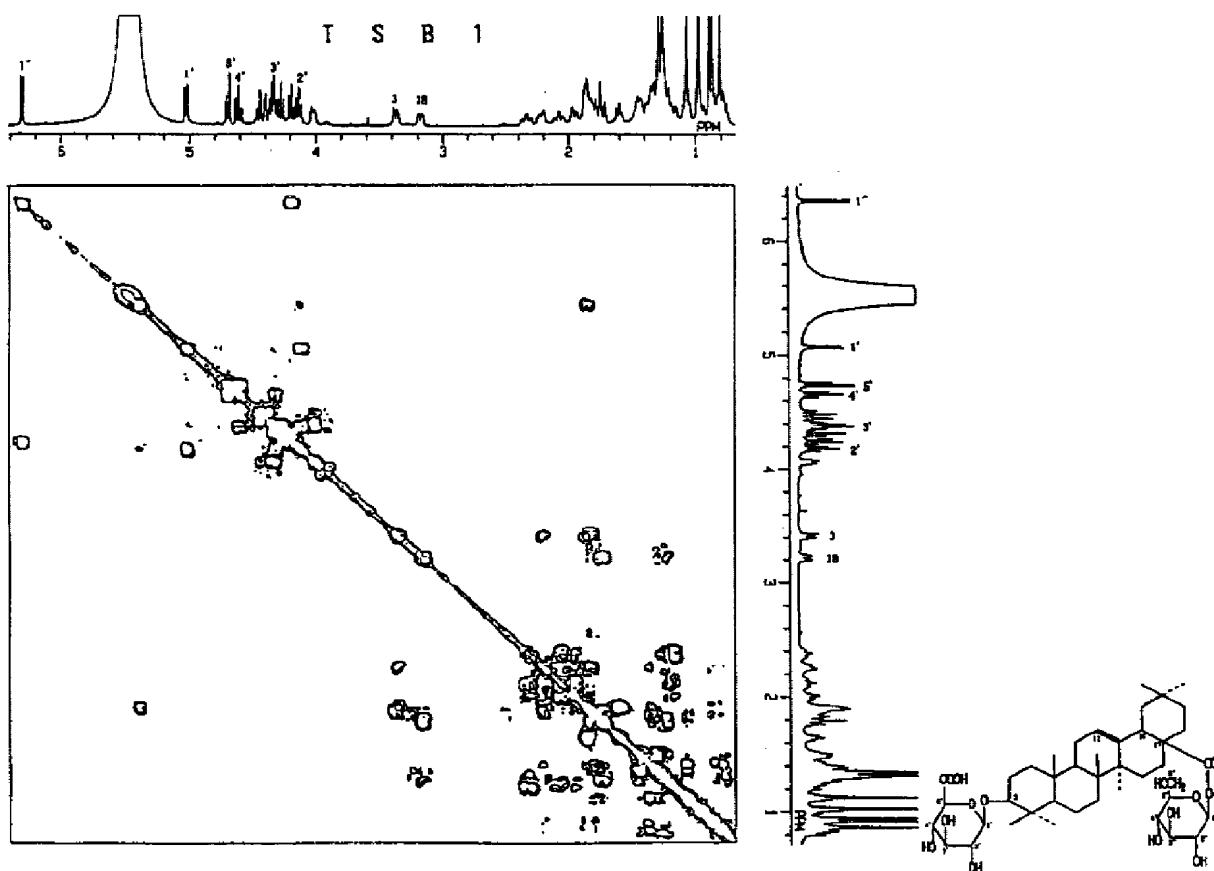
【図4】

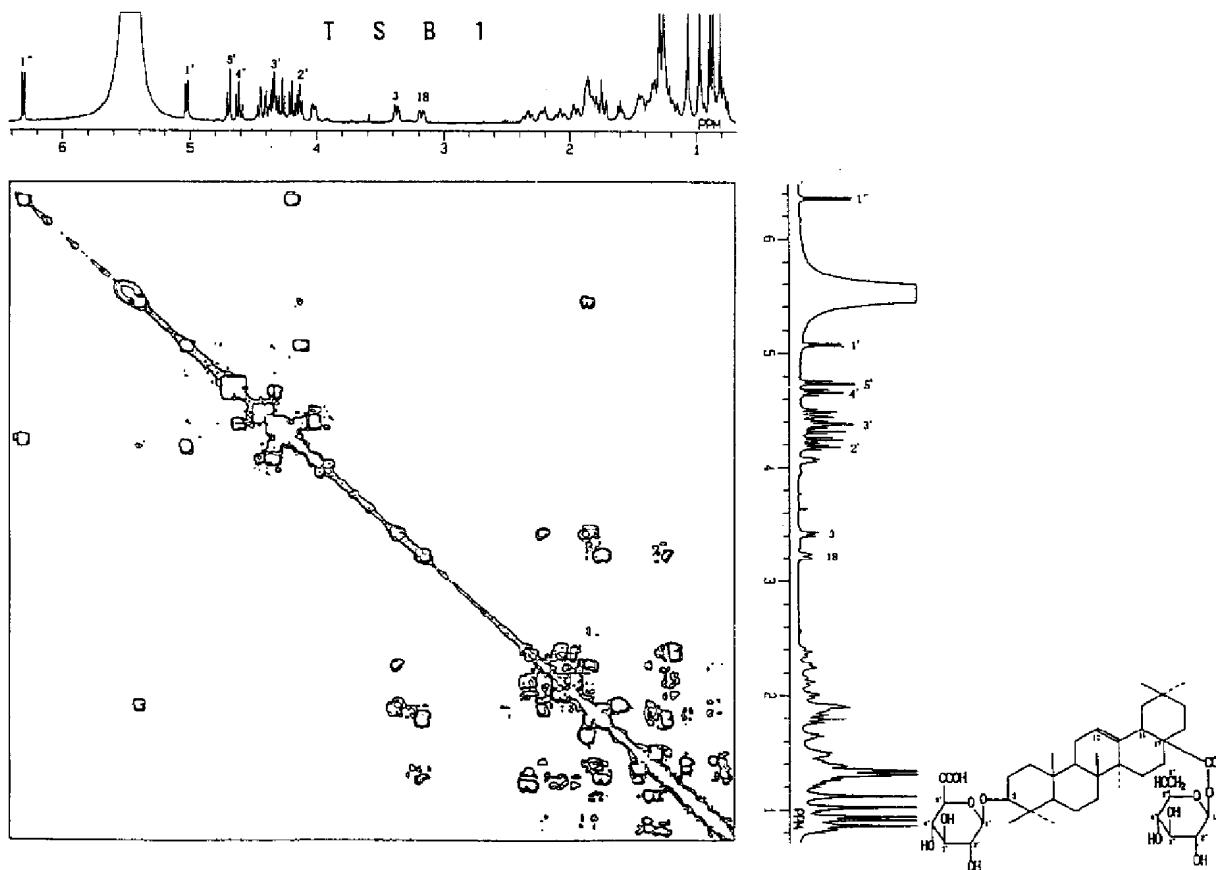


【图5】

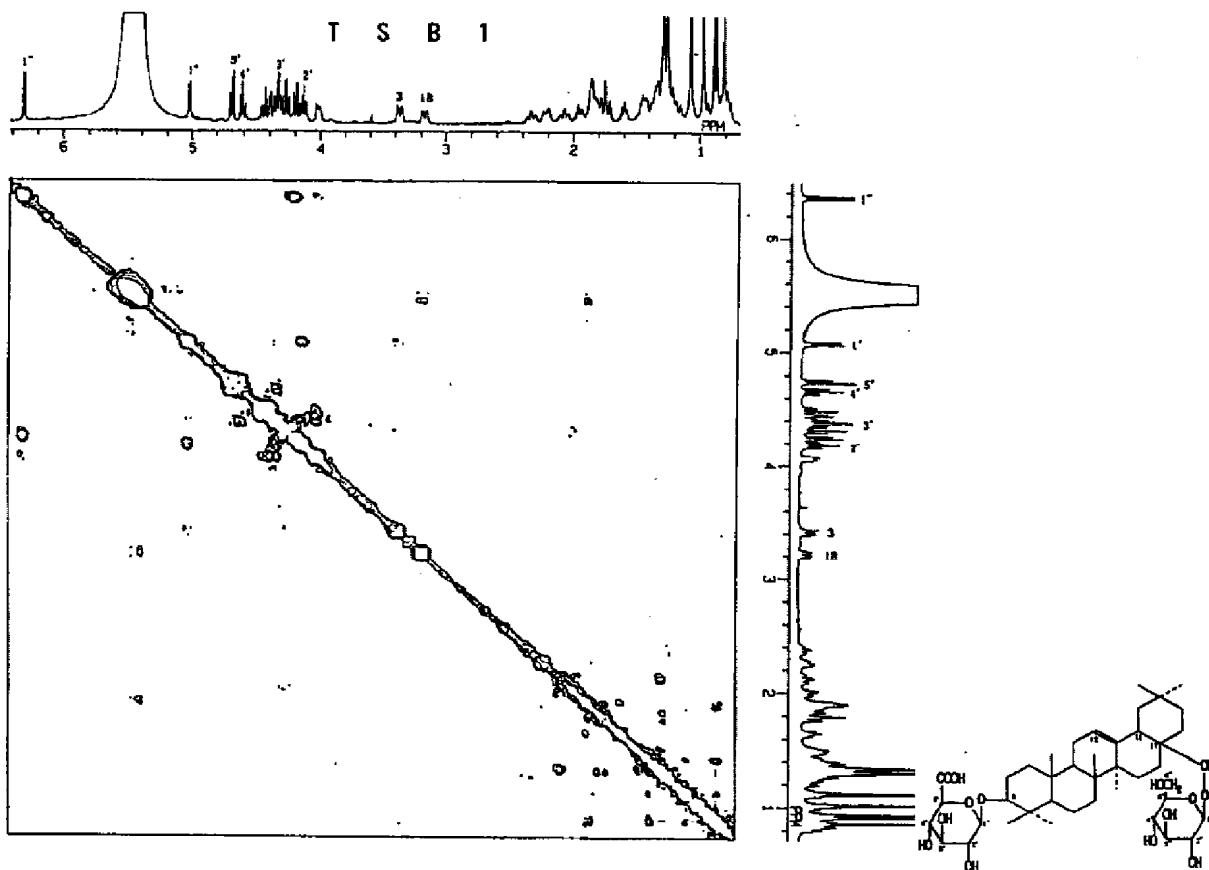


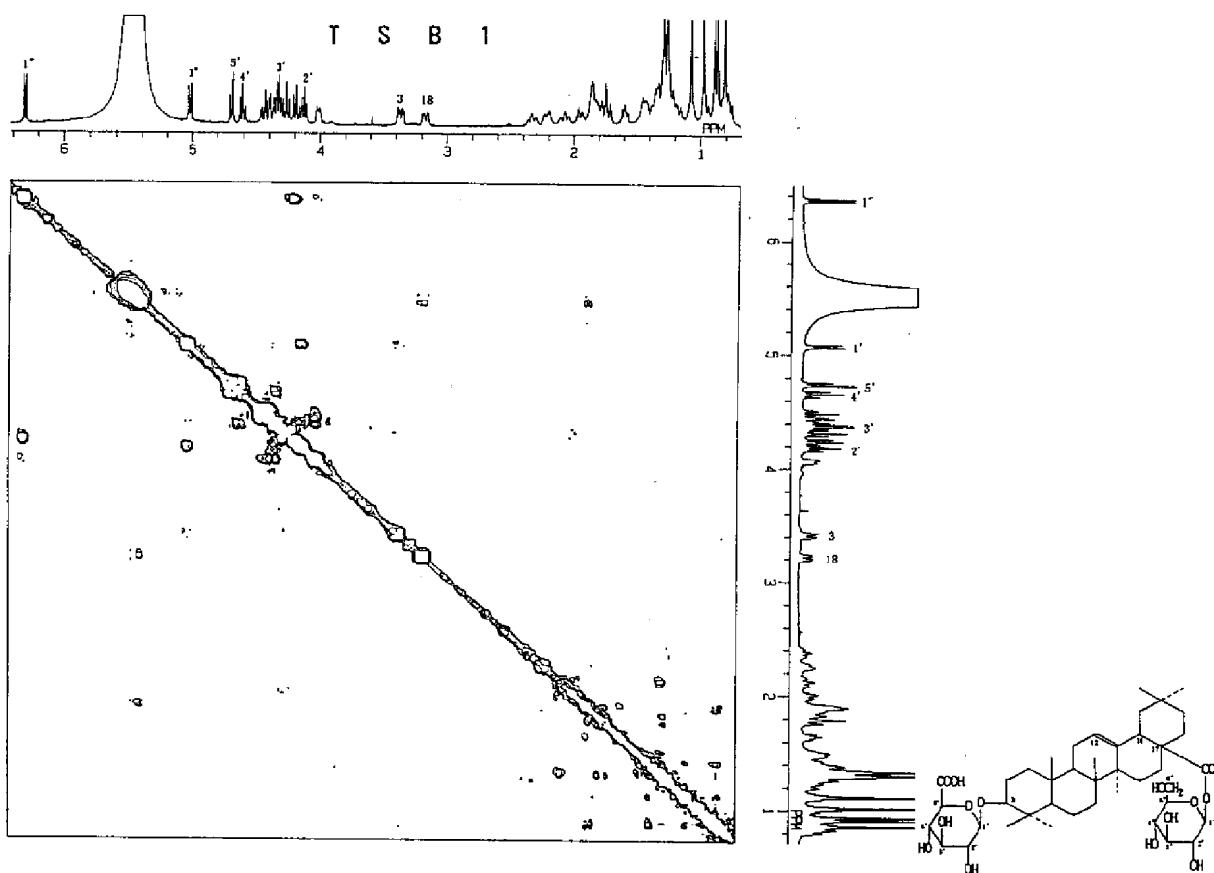
【図6】





【図7】





フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 J 63/00		7433-4C		
C 12 N 5/04				
C 12 P 19/56		7432-4B		
33/00		9452-4B		
//(C 12 P 19/56				
C 12 R 1:91)				
(C 12 P 33/00				
C 12 R 1:91)				